



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních
patogenů drůbeže k antimikrobiálním
látkám stanovením minimálních
inhibičních koncentrací

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D.
MVDr. Monika Zouharová, Ph.D.
Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D.,
MVDr. Jiří Bureš
MVDr. Tomáš Krejčí
prof. MVDr. Alfred Hera, CSc.

Certifikovaná metodika č. 71/2015

Vyšetření citlivosti/rezistence bakteriálních patogenů drůbeže k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací

Autoři:

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

MVDr. Monika Zouharová, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70, Brno

Mgr. Lucie Pokludová, Ph.D., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 232/56a, Brno

MVDr. Jiří Bureš, Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 232/56a, Brno

MVDr. Tomáš Krejčí, LabMediaServis, s.r.o., Vítězná 92, 544 01 Huntířov

prof. MVDr. Alfred Hera, CSc., Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Hudcova 232/56a, Brno

Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č. SVS/2016/006578-G

CERTIFIKOVANÁ METODIKA ze dne 20. 1. 2016

Vydala: Státní veterinární správa, Slezská 7/100, 120 56 Praha 2

Certifikovaná metodika byla vypracována v rámci projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS, číslo grantu QJ 1210119 a projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR LO1218. Výsledky projektu LO1218 byly získány za finanční podpory MŠMT v rámci programu NPU I.

ISBN 978-80-86895-79-6

Cíl metodiky

Cílem vypracování certifikované metodiky je zavedení standardní metodiky stanovení kvantitativní úrovně citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám stanovením minimálních inhibičních koncentrací (MIC) do široké veterinární laboratorní praxe, kde nejsou zcela zharmonizovány metody stanovení a interpretace výsledků citlivosti pro spektrum veterinárně významných patogenů jednotlivých druhů zvířat. Ve veterinárních laboratořích je v současné době používána jednoduchá kvalitativní disková difúzní metoda, která není v některých případech dostatečně citlivá a u některých patogenů se její využití ke stanovení citlivosti/rezistence k antimikrobiálním látkám doslova nedoporučuje. Pro zavedení metody stanovení MIC antimikrobiálních látek do praxe ve veterinárních laboratořích nejsou v současnosti pro tyto laboratoře cenově dostupné sety ke stanovení MIC s veterinárními antimikrobiálními látkami nebo je jejich cena vzhledem k nákupu v zahraničí velmi vysoká.

Pro splnění cíle metodiky byly vyvinuty a následně jsou vyráběny sety pro stanovení MIC u významných patogenů drůbeže, které mohou výrazně zvýšit úroveň veterinární diagnostiky bakteriálních rezistencí u terapeuticky používaných antimikrobik. Údaje o stavu a vývoji rezistence bakteriálních původců infekcí jsou nezbytné pro predikci účinnosti antimikrobiálních látek v úvodní antibiotické léčbě a v určení pozice jednotlivých látek jako léků volby a léků alternativních v terapii infekcí. Jsou proto rozhodujícím podkladem pro vytváření objektivních a na farmaceutickém průmyslu nezávislých doporučených postupů pro antibiotickou léčbu.

I) Vlastní popis metodiky

Předkládaná metodika představuje komplexní postup pro stanovení citlivostí/rezistencí bakteriálních patogenů drůbeže od odběru vzorků k bakteriologickému vyšetření až po interpretaci výsledků. Stanovení MIC antimikrobiálních látek k bakteriálním patogenům bude ve veterinární oblasti výrazným přínosem zejména zavedením zlatého standardu, tj. mikrodiluční metody pro testování a hodnocení citlivosti u veterinárních patogenů především z důvodů získání vyšší úrovně dosažených výsledků, které bude možné použít k vyhodnocení šíření rezistencí v bakteriálních populacích.

Hodnoty MIC jednotlivých antimikrobiálních látek bakteriálních izolátů budou stanovovány zcela v souladu se standardizovanými metodikami Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013a,b), European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2014) a Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2014) pomocí originálních setů se speciálním výběrem testovaných antimikrobiálních látek, který umožňuje testování rezistencí především veterinárních antimikrobik užívaných k léčbě nemocí drůbeže a jejichž lékové formy jsou v ČR registrovány. Na mikrotitrační destičce s 96 jamkami - 12 sloupců (1-12) a 8 řádků (A-H) jsou ve sloupcích dvojkové ředící řady dvanácti navržených antimikrobiálních látek, u jedenácti antimikrobiálních látek (sloupce 1-11) je na destičce 8 ředění (řádky A-H) a u jedné antimikrobiální látky (sloupec 12) je 7 ředění (řádky B-H) a v řádku A je jamka s médiem bez antimikrobiální látky sloužící jako pozitivní kontrola růstu testovaných bakterií. Počáteční koncentrace jednotlivých antimikrobiálních látek na destičce jsou rozdílné a jsou voleny tak, aby hodnoty MIC vyšetřovaných bakterií zahrnovaly rozmezí breakpointů citlivosti/rezistence podle závazných mezinárodních metodik CLSI,

EUCAST a CA-SFM a rozmezí hodnot MIC bakteriálních kmenů povinně testovaných v rámci kontroly kvality (Tab. 1).

Tab. 1: Set ke stanovení MIC antimikrobiálních látek u bakteriálních patogenů drůbeže

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PEN	AMP	AMC	ENR	ERY	GEN	CLI	SXT	FFC	TET	DOX	NEO
8	16	32	8	16	64	16	4	64	32	16	PKR
4	8	16	4	8	32	8	2	32	16	8	128
2	4	8	2	4	16	4	1	16	8	4	64
1	2	4	1	2	8	2	0,5	8	4	2	32
0,5	1	2	0,5	1	4	1	0,25	4	2	1	16
0,25	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	2	1	0,5	8
0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,06	1	0,5	0,25	4
0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	0,5	0,125	0,03	0,5	0,25	0,125	2

Koncentrace antimikrobiálních látek v tabulce mg/l; koncentrace pro amoxicilin/kyselina klavulanová odpovídá koncentraci amoxicilinu; koncentrace pro trimethoprim/sulfamethoxazol odpovídá koncentraci trimethoprimu

PEN	penicilin
AMP	ampicilin
AMC	amoxicilin/klavulanová kyselina 2/1
ENR	enrofloxacin
ERY	erytromycin
GEN	gentamicin
CLUI	klindamycin
SXT	trimethoprim/sulfamethoxazol 1/19
FFC	florfenikol
TET	tetracyklin
DOX	doxycyklin
NEO	neomycin

Sety budou vyráběny ve dvou modifikacích, které se budou lišit ve složení živného média, v němž budou ředěny antimikrobiální látky:

- 1. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově nenáročných bakterií – CAMHB (Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth)**
- 2. Set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných bakterií – CAMHB s 5 % lyzované koňské krve**

Sety musí být skladovány zamrazené při teplotě – 80 °C. Po rozmrazení a temperování setu na kultivační teplotu je nutné provést inokulaci destičky do 1h. Rozmrazené sety se nesmí opětovně zamrazit (riziko degradace antimikrobiálních látek). Při skladování setů v -80 °C je expirace 6 měsíců ode dne výroby.

Kontrola kvality setů do doby expirace je na pracovišti výrobce setů sledována pravidelným týdenním testováním kontrolních kmenů, které jsou přesně definovány a jejich hodnoty MIC k antimikrobiálním látkám jsou uvedeny v laboratorních standardech CLSI, EUCAST a CA-SFM. Stanovené hodnoty MIC jednotlivých antimikrobik musí být v rozmezí definovaných hodnot MIC referenčních kmenů dle CLSI, EUCAST a CA-SFM.

Pro set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově nenáročných bakterií s CAMHB se jako referenční kmeny použijí *Escherichia coli* – ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* – ATCC 29213 a *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212 (Tab. 2, 3 a 4). Pro set ke stanovení MIC k antimikrobiálním látkám u růstově náročných bakterií s CAMHB + 5 % lyzované koňské krve se jako referenční kmen použije *Streptococcus pneumoniae* – ATCC 49619 (Tab. 5).

Stanovené rozmezí hodnot MIC testovaných kontrolních kmenů (mg/l) je vyznačeno v tabulkách (Tab. 2, 3, 4 a 5) šedou barvou. Pokud u některých antimikrobiálních látek není pro některý z kontrolních kmenů vyznačeno šedé rozmezí hodnot MIC, není testování této látky relevantní pro určitý bakteriální druh (antimikrobiální látka není účinná nebo vhodná pro léčbu onemocnění tímto mikroorganismem) nebo nejsou k dispozici dostupná data.

Tab. 2: Rozmezí MIC u kmene *Escherichia coli* – ATCC 25922

	PEN	AMP	AMC	ENR	ERY	GEN	CLI	SXT	FFC	TET	DOX	NEO
A	8	16	32	8	16	64	16	4	64	32	16	PKR
B	4	8	16	4	8	32	8	2	32	16	8	128
C	2	4	8	2	4	16	4	1	16	8	4	64
D	1	2	4	1	2	8	2	0,5	8	4	2	32
E	0,5	1	2	0,5	1	4	1	0,25	4	2	1	16
F	0,25	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	2	1	0,5	8
G	0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,06	1	0,5	0,25	4
H	0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	0,5	0,125	0,03	0,5	0,25	0,125	2
				≤		≤		≤				

Tab. 3: Rozmezí MIC u kmene *Staphylococcus aureus* – ATCC 29213

	PEN	AMP	AMC	ENR	ERY	GEN	CLI	SXT	FFC	TET	DOX	NEO
A	8	16	32	8	16	64	16	4	64	32	16	PKR
B	4	8	16	4	8	32	8	2	32	16	8	128
C	2	4	8	2	4	16	4	1	16	8	4	64
D	1	2	4	1	2	8	2	0,5	8	4	2	32
E	0,5	1	2	0,5	1	4	1	0,25	4	2	1	16
F	0,25	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	2	1	0,5	8
G	0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,06	1	0,5	0,25	4
H	0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	0,5	0,125	0,03	0,5	0,25	0,125	2
			≤	≤		≤	≤	≤		≤		

Tab. 4: Rozmezí MIC u kmene *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212

	PEN	AMP	AMC	ENR	ERY	GEN	CLI	SXT	FFC	TET	DOX	NEO
A	8	16	32	8	16	64	16	4	64	32	16	PKR
B	4	8	16	4	8	32	8	2	32	16	8	128
C	2	4	8	2	4	16	4	1	16	8	4	64
D	1	2	4	1	2	8	2	0,5	8	4	2	32
E	0,5	1	2	0,5	1	4	1	0,25	4	2	1	16
F	0,25	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	2	1	0,5	8
G	0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,06	1	0,5	0,25	4
H	0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	0,5	0,125	0,03	0,5	0,25	0,125	2
								≤				

Tab. 5: Rozmezí MIC u kmene *Streptococcus pneumoniae* – ATCC 49619

	PEN	AMP	AMC	ENR	ERY	GEN	CLI	SXT	FFC	TET	DOX	NEO
A	8	16	32	8	16	64	16	4	64	32	16	PKR
B	4	8	16	4	8	32	8	2	32	16	8	128
C	2	4	8	2	4	16	4	1	16	8	4	64
D	1	2	4	1	2	8	2	0,5	8	4	2	32
E	0,5	1	2	0,5	1	4	1	0,25	4	2	1	16
F	0,25	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	2	1	0,5	8
G	0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,06	1	0,5	0,25	4
H	0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	0,5	0,125	0,03	0,5	0,25	0,125	2
			≤		≤		≤				≤	

IIa) Odběr vzorků k bakteriologickému vyšetření a transport vzorků do laboratoře

Odběr klinických vzorků se provádí *in vivo* nebo *post mortem*. Místo odběru vzorků je zvoleno podle klinických příznaků onemocnění. *In vivo* je možné provést u respiračních obtíží nasální výtěr, případně výtěr dutiny ústní a mandlí, u enterálních onemocnění se odebírají vzorky trusu nebo koloakální výtěry. V případě dermatitid stíráme postižené místo. *Post mortem* se odebírají změněné části postižených orgánů – plic, srdce a osrdečníku u respiračních infekcí a vzorky střev u enterálních infekcí. U systémových onemocnění je vhodné odebrat vzorky nebo stěry ze všech patologicky změněných orgánů.

Odebrané klinické vzorky se po odběru uloží do chladicího boxu a co nejrychleji, nejpozději však do 24 hodin, se dopraví do laboratoře k dalšímu zpracování. Stěry je vhodné uchovávat a transportovat na tamponech s transportním médiem z důvodu krátkodobého přežívání bakterií ve vnějším prostředí.

IIb) Laboratorní zpracování vzorků, izolace a identifikace původce onemocnění

V diagnostické laboratoři se provádí kultivační vyšetření z klinických vzorků obvyklým způsobem na neselektivním agarovém médiu, např. krevní agar. Inkubace probíhá při teplotě 34 °C - 37 °C po 18 h – 24 h (doba inkubace může být podle potřeby prodloužena). Následná izolace původce z primokultivací se provádí podle druhů bakterií, které jsou podle předpokladu původci onemocnění, na selektivních i neselektivních agarových médiích. Vždy je nutná přesná identifikace druhu původce onemocnění (prováděná biochemickými, molekulárně diagnostickými a jinými povinnými nebo doporučovanými testy), protože metodika provedení stanovení MIC antimikrobiálních látek a interpretace výsledků vyšetření, zda se jedná o izolát citlivý nebo rezistentní k dané antimikrobiální látce, úzce souvisí s vyšetřovaným bakteriálním druhem.

IIC) Stanovení minimální inhibičních koncentrací antimikrobiálních látek

1. Veterinární sety pro stanovení MIC u růstově nenáročných bakterií

Stanovení MIC u růstově nenáročných bakterií se provádí na destičkách s CAMHB.

1.1. Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 h – 24 h (pokud není požadován delší čas inkubace) do sterilního bujónu nebo fyziologického roztoku. Denzita suspenze se bujónem nebo fyziologickým roztokem upraví na zákal 0,5 McFarlanda, který na fotometru (vlnová délka 625 nm, kyveta s optickou dráhou 1 cm) odpovídá absorpenci 0,08 – 0,13 nebo je možné použít jiný vhodný ověřený nefelometr nebo denzitu alternativně vyhodnotit vizuálně podle zákalového standardu McFarland. Bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda (odpovídá 5×10^8 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922) se dále naředí na finální koncentraci inokula v jamce mikrotitrační desky 5×10^5 CFU.

Příklad postupu:

1 ml inokula o denzitě 0,5 MCFarlanda se naředí 9 ml sterilního fyziologického roztoku (odpovídá 5×10^7 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922), po přenesení 5 µl takto naředěného inokula do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 µl bujónu je dosažena finální koncentrace inokula v jamce 5×10^5 CFU.

1.2. Naočkování mikrotitračních destiček

Rozmražené mikrotitrační destičky se musí naočkovat do 15 min. po standardizaci suspenze inokula. Do každé jamky destičky obsahující 100 μ l zředěné antimikrobiální látky v bujónu se přidá maximálně 5 μ l suspenze zředěného inokula. (Multikanálovou pipetou přesně 5 μ l nebo inokulátorem – ježkem).

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná denzita inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 μ l bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenesou 100 μ l kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyrostou 20 – 80 kolonií.

Ověření bakteriální čistoty: Z jamky bez antimikrobiální látky (pozice 12A na destičce) se odebere 100 μ l, které se kultivují na neselektivním agarovém médiu při 34 – 37 °C po dobu 18 – 24 hodin.

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavřou těsnícím víčkem nebo lepicí fólií.

1.3. Inkubace mikrotitračních destiček

Naočkované destičky musí být vloženy do inkubátoru do 15 minut po inokulaci. Pokud se pro testovaný bakteriální druh neuvádí jinak, mikrotitrační destičky pro růstově nenáročné mikroorganismy se inkubují aerobně při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 – 20 hodin.

1.4. Kontrola kvality výsledků

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčních kmenů stejným způsobem, jakým je prováděna kontrola kvality vyrobených setů (viz bod. II).

1.5. Odečítání výsledků

Výsledky se odečítají po dosažení dostatečného nárůstu mikroorganismu (usazenina nebo zřetelný zákal) a po ověření bakteriální čistoty a příslušné koncentrace inokula. Zjištěná hodnota MIC představuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která plně inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu.

2. Veterinární sety pro stanovení MIC u růstově náročných bakterií – *Streptococcus* spp., *Pasteurella multocida*

Stanovení MIC u izolátů *P. multocida* se provádí na destičkách s CAMHB. Destičky s CAMHB s přidavkem lyzované koňské krve se použijí při stanovení MIC izolátů *S. hyicus*, *Streptococcus* spp. a také při opakovaném provedení stanovení MIC u izolátů *P. multocida*, u kterých v CAMHB nebyla vyhovující pozitivní kontrola růstu v jamce bez antimikrobiální látky.

2.1. Příprava inokula

Bakteriologickou kličkou se odebere 3 – 5 bakteriálních kolonií kultivovaných na neselektivním agarovém médiu (inkubovaných při teplotě 34 °C - 37 °C po dobu 18 h – 24 h (pokud není požadován delší čas inkubace) do sterilního bujónu nebo fyziologického roztoku. Denzita suspenze se bujónem nebo fyziologickým roztokem upraví na zákal 0,5 McFarlanda, který na fotometru (vlnová délka 625 nm, kyveta s optickou dráhou 1 cm) odpovídá absorbanci 0,08 – 0,13 nebo je možné použít jiný vhodný ověřený nefelometr nebo denzitu alternativně vyhodnotit vizuálně podle zákalového standardu McFarland. Bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlanda (odpovídá 5×10^8 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922) se dále naředí na finální koncentraci inokula v jamce mikrotitrační desky 5×10^5 CFU.

Příklad postupu:

1 ml inokula o denzitě 0,5 MCFarlanda se naředí 9 ml sterilního fyziologického roztoku (odpovídá 5×10^7 CFU pro *E. coli* ATCC 25 922), po přenesení 5 µl takto naředěného

inokula do jamky mikrotitrační desky s obsahem 100 µl bujónu je dosažena finální koncentrace inokula v jamce 5×10^5 CFU.

2.2. Naočkování mikrotitračních destiček

Rozmražené mikrotitrační destičky se musí naočkovat do 15 min. po standardizaci suspenze inokula. Do každé jamky destičky obsahující 100 µl zředěné antimikrobiální látky v bujónu se přidá maximálně 5 µl suspenze zředěného inokula. (Multikanálovou pipetou přesně 5 µl nebo inokulátorem – ježkem).

Okamžitě po naočkování se ověří skutečná denzita inokula. Z jamky pozitivní kontroly růstu se odebere 10 µl bakteriální suspenze, která se následně zředí v 10 ml bujónu nebo fyziologickém roztoku. Z tohoto ředění se přenesou 100 µl kultury na vhodnou agarovou půdu, která se inkubuje přes noc. Zkouška se považuje za vyhovující, pokud na agarové půdě vyrostou 20 – 80 kolonií.

Ověření bakteriální čistoty: Z jamky bez antimikrobiální látky (pozice 12A na destičce) se odebere 100 µl, které se kultivují na neselektivním agarovém médiu při 34 – 37 °C po dobu 18 – 24 hodin.

Před inkubací se mikrotitrační destičky uzavřou těsnícím víčkem nebo lepicí fólií.

2.3. Inkubace mikrotitračních destiček

Naočkované destičky musí být vloženy do inkubátoru do 15 minut po inokulaci. Mikrotitrační destičky pro *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus* spp. a *Pasteurella multocida* se inkubují v teplotě 35 °C po dobu 18 – 24 hodin.

2.4. Kontrola kvality výsledků

Kvalita výsledků se kontroluje paralelně s testovaným mikroorganismem stanovením MIC antimikrobiálních látek u referenčních kmenů stejným způsobem, jakým je prováděna kontrola kvality vyrobených setů (viz bod. II).

2.5. Odečítání výsledků

Výsledky se odečítají po dosažení dostatečného nárůstu mikroorganismu (usazenina nebo zřetelný zákal) a po ověření bakteriální čistoty a příslušné koncentrace inokula. Zjištěná hodnota MIC představuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která plně inhibuje viditelný růst testovaného mikroorganismu.

II d) Interpretace výsledků

Interpretace výsledků do kategorií citlivosti vyžaduje použití tzv. klinických breakpointů antimikrobiálních látek. Vyšetřovaný kmen bakterie lze kategorizovat za předpokladu, že příslušné breakpointy jsou použity v definovaném fenotypovém systému. Breakpointy rozdělují izoláty na citlivé, středně citlivé a rezistentní (Tab. 7).

Tab. 7: Breakpointy antimikrobiálních látek

PEN ^a	AMP	AMC	ENR	ERY ^b	GEN	CLI	SXT	FFC ^c	TET ^d	DOX	NEO
8	16	32	8	16	64	16	4	64	32	16	PKR
4	8	16	4	8	32	8	2	32	16	8	128
2	4	8	2	4	16	4	1	16	8	4	64
1	2	4	1	2	8	2	0,5	8	4	2	32
0,5	1	2	0,5	1	4	1	0,25	4	2	1	16
0,25	0,5	1	0,25	0,5	2	0,5	0,125	2	1	0,5	8
0,125	0,25	0,5	0,125	0,25	1	0,25	0,06	1	0,5	0,25	4
0,06	0,125	0,25	0,06	0,125	0,5	0,125	0,03	0,5	0,25	0,125	2

MIC stanovená v rozmezí koncentrací označených zeleně = citlivý kmen; modře = středně citlivý kmen a oranžově = rezistentní kmen

^a Interpretační kritéria pro penicilin jsou uvedeny v samostatné tabulce

^b Erytromycin – pro *Streptococcus* spp. jsou kmeny citlivé do MIC ≤0,25 mg/l, středně citlivé pokud je MIC 0,5 mg/l a rezistentní od MIC ≥8 mg/l

^c Florfenikol – breakpoint pro platí pouze pro premixy

^d Tetracyklin – breakpoint platí pouze pro injekční aplikaci

Interpretační kritéria pro penicilin:

	C	I	R
<i>Staphylococcus</i> spp.	≤0,125	-	≥0,25
<i>Streptococcus</i> spp.	≤0,125	0,25 - 2	≥4
<i>Enterococcus</i> spp.	≤16	32 - 64	≥128
G- bakterie	≤0,25	0,5	≥1

C= citlivý; I = středně citlivý; R = rezistentní

Breakpointy pro AMP, AMC, ENR, GEN, CLI, FFC, TET vychází z veterinárních kritérií (breakpoint pro izoláty z drůbeže je stanoven pouze pro ENR, ostatní breakpointy jsou odvozené z breakpointů stanovených pro jiné druhy zvířat) - CLSI (2013)

Breakpointy pro PEN, ERY, SXT vychází z veterinárních kritérií odvozených z humánních interpretačních standardů (není stanoven pro jednotlivé druhy zvířat) - CLSI (2013)

Breakpointy pro DOX, NEO vychází z interpretačních kritérií CA-SFM (2014)

III. Srovnání „novosti postupů“

Set ke stanovení MIC bakteriálních izolátů z drůbeže obsahuje speciálně vybrané testované antimikrobiální látky a umožňuje testování citlivosti/rezistence bakteriálních izolátů k veterinárně specifickým antimikrobiálním látkám, které jsou užívány k léčbě infekčních onemocnění drůbeže a jsou v ČR registrovány. V současné době je k testování rezistencí těchto specifických veterinárních antimikrobik možné využít pouze omezenou nabídku setů zahraniční výroby, které většinou vzhledem k zastoupení antimikrobik ne zcela odpovídají potřebám testování v České republice. Vývoj a výroba nového setu ke stanovení rezistencí bakteriálních patogenů drůbeže reaguje na aktuální potřebu veterinárních diagnostických laboratoří a nabízí řešení problému, které může zahraničním výrobkům konkurovat kvalitou provedení, originalitou a především cenovou dostupností.

Metody vyšetření citlivosti/rezistence patogenů k antimikrobiálním látkám a v neposlední řadě také interpretace zjištěných výsledků nejsou v současné době jednotné a neposkytují proto relevantní výsledky pro klinickou veterinární praxi. V předkládané metodice je navrženo komplexní harmonizované řešení metod vzorkování, vyšetření a interpretace výsledků rezistence/citlivosti bakteriálních patogenů drůbeže s významem pro humánní i veterinární oblast. Realizací těchto metod bude dosažena potřebná úroveň výsledků ke sledování a vyhodnocení šíření rezistencí k antimikrobiálním látkám v bakteriálních populacích.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je určena pro veterinární diagnostické laboratoře - certifikovaná veterinární antibiotická střediska, veterinární nebo výzkumné laboratoře, Státní veterinární ústavy a soukromé veterinární laboratoře. Je možné její uplatnění v systému celonárodního monitoringu citlivosti/rezistence vybraných veterinárních patogenů k antimikrobiálním látkám vyhodnoceného na základě harmonizovaných standardních postupů. V konečném důsledku se uplatnění metodiky projeví ve zkvalitnění terapie infekčních bakteriálních onemocnění drůbeže vhodnou volbou léčiv.

V. Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení postupů uvedených v metodice jsou minimální (0 – 5 tis. Kč), protože jejich provedení nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení bakteriologické laboratoře, je možné s využitím běžných přístrojů a pomůcek (termostat, pipety) a spotřebního materiálu.

Ekonomický přínos pro laboratoře bude představovat zisk z provedených vyšetření. Např. za předpokladu vyšetření v jedné laboratoři cca 500 vzorků ročně při ceně za jedno vyšetření kolem 500,- Kč, by se zisk 20 % z tržeb mohl pohybovat kolem 50 tis. pro tuto laboratoř.

V konečném důsledku budou uživatelé výsledků vyšetření chovatelé drůbeže, kterým se sníží zlepšením diagnostiky ekonomické náklady na léčbu a prevenci onemocnění. Největšími producenty na drůbežářském trhu jsou chovatelé brojlerů. Za předpokladu, že by cílenou léčbou bylo zabráněno úhynům u 0,01 % porážených chovných zvířat ročně (produkce průměrně 140 tis. tun kuřecího masa) při průměrné výkupní ceně 23,- Kč/ kg ž. hm. s jateční výtěžností 75 %, by byly ekonomické ztráty chovatelů sníženy o 2 415 000,- Kč ročně. Zdroj dat: Český statistický úřad, Zemědělství (odhadnutá roční produkce kuřecího masa a výkupní ceny vychází z údajů za 1., 2. a 3. čtvrtletí roku 2015).

VI. Seznam použité a související literatury

CLSI, 2013a. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-A4, vol. 33, No. 7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 73 pp.

CLSI, 2013b. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Informational Supplement. Vet 01-S2, vol. 33, No 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne 2013: 63 pp.

EUCAST - Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. Version 5.13. [Database online]. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, [cit. 2015-11-14]. available in www: <<http://217.70.33.99/Eucast2/>>

CA-SFM 2014. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2014. Lyon, France 2014: 122 pp.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz